

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОБИОТИКА БПС-44 С ЦЕЛЬЮ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ ГЕРБИЦИДОВ НА РЫБ

А.А. Жиденко, Е.В. Бибчук, В.В. Кривошиша

Черниговский национальный педагогический университет имени Т.Г. Шевченко,  
Чернигов, Украина

chgpu@chgpu.cv.ua; zaa2006@ukr.net

Многочисленные исследования, проведенные в лаборатории экологической физиологии и биохимии водных организмов Черниговского национального педагогического университета имени Т.Г. Шевченко (Жиденко, 2009, Мехед, 2005), показали неблагоприятное влияние гербицидов на организм карпа. Степень патологии на разных уровнях организации рыб зависит от физико-химических свойств гербицидов, их растворимости в воде и в органических растворителях, от значений Log P, от распределения в водной среде, дозы и длительности действия гербицида, а также от вида, породы, возраста рыб и присутствия в воде других загрязнителей. В прибрежных акваториях и в пресных водоемах фиксируется наличие ядохимикатов в тех случаях, когда поблизости используют большое количество пестицидов для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур и древесной растительности. Согласно Интернету (<http://www.3gm.info.>, 2011), самым продаваемым в мире гербицидом в настоящее время является «Раундап» (производитель компания «Монсанто»), так как он применяется на трансгенных растениях, а большая их часть имеет устойчивость к этому химикату. Резистентность к раундапу является основной целью генной модификации более 70 процентов существующих сегодня ГМ-культур. В недавно опубликованном исследовании (Benachour&Se'ralini, 2008) было показано, что гербицид "Раундап", к которому устойчивы наиболее распространенные ГМ-культуры, даже в самых минимальных количествах (0.000001%) приводит к гибели клеток эмбрионов, клеток пуповинной крови и плаценты человека, запуская апоптоз (запрограммированную смерть клеток) (<http://www.3gm.info.>, 2011). Обработка соевых бобов гербицидами проводится с помощью самолета, поэтому определенная их часть попадает в близлежащие водоемы, в организм гидробионтов и далее – в пищу человеку.

Целью работы было установить возможность использования пробиотика БПС-44 для предотвращения токсического влияния глифосата на показатели белковых фракций в сыворотке крови и печени сеголеток карпа чешуйчатого. Известно, что применение данного пробиотика приводит к улучшению протекания зимовки карповых рыб (Смольский и др., 2004) и повышению жизнеспособности икры рыб в условиях гербицидного загрязнения (Барбухо, 2010).

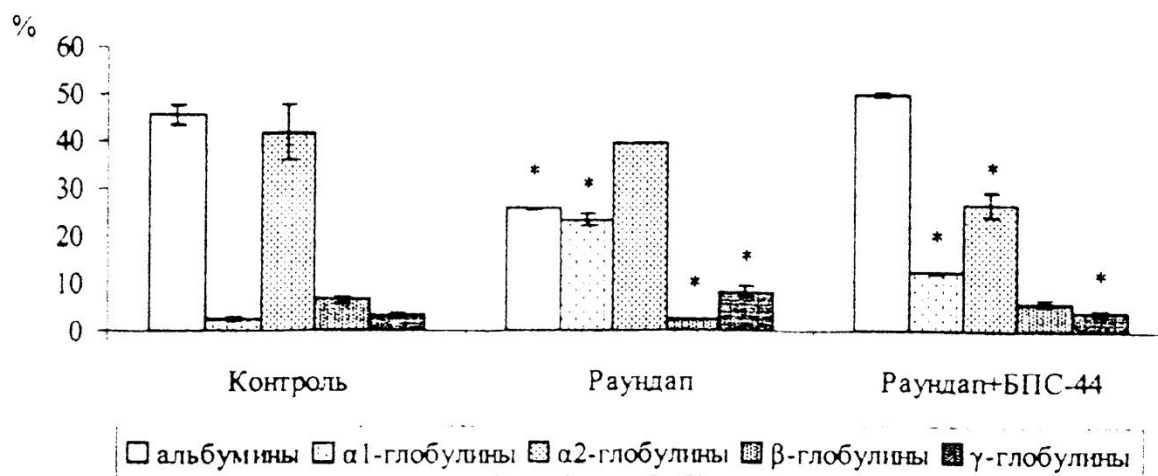
Эксперименты проводились в лаборатории экологической физиологии и биохимии водных организмов Черниговского национального педагогического университета имени Т.Г. Шевченко на сеголетках карпа *Cyprinus carpio*, выращенных в ОАО "Черниговрыбхоз". Рыб содержали в 200 л аквариумах с отстоянной водопроводной водой, которую постоянно аэрировали и меняли через каждые трое суток. Величина pH составляла  $7,50 \pm 0,25$ , содержание кислорода –  $5,6 \pm 0,4$  мг/л, температура воды выдерживалась приближенной к природной, в зависимости от сезона. Карпов в аквариумах размещали из расчета 20 л воды на одну особь в трех вариантах: 1) контроль; 2) действие 2 ПДК (предельно допустимая концентрация  $0,04$  мг/дм<sup>3</sup>) (Седокур, 1986) гербицида «Раундап» (действующее вещество — изобропиламинная соль глифосата, N-фосфометилглицин, 480 г/л) (Перелік пестицидів, 2001); 3) при совместном влиянии пробиотического препарата

БПС-44 (с концентрацией микроорганизмов *Bacillus subtilis 44-p*  $1,25 \times 10^8$  КОЕ микробных клеток на  $1 \text{ дм}^3$  воды, которые добавляли в виде суспензии в воду аквариума за 1 сутки до глифосата), и 2 ПДК «Раундапа». Во всех вариантах эксперимента количество использованных рыб составило по 12 экземпляров. Пробиотический препарат БПС-44 (ТУО 24.4-00497360-691-2003) был создан на основе штамма бактерий *Bacillus subtilis 44-p* в Институте сельскохозяйственной микробиологии НААНУ, г. Чернигов. Во всех трех случаях в течение 14 суток эксперимента контролировали гидрохимический режим.

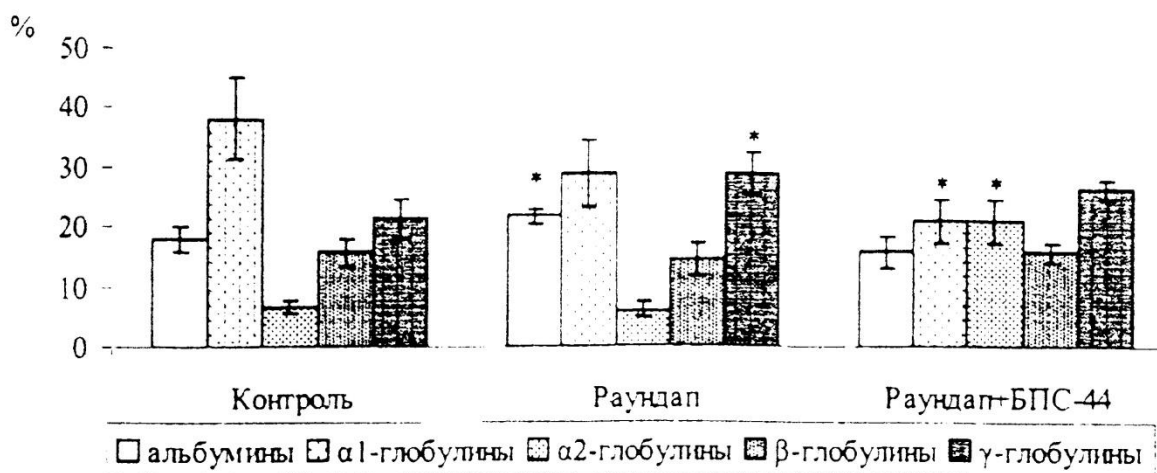
Материалом биохимического исследования была печень и кровь сеголеток карпа чешуйчатого. Для анализа навески замороженных тканей печени измельчали с помощью гомогенизатора РТ-2 и после центрифугирования (3000 об, 15 мин.) в центрифугате определяли количественные значения биохимических показателей. Отбор крови и получение сыворотки проводили по общепринятой методике (Давыдов, 2005). Использованный нами метод определения белковых фракций базируется на том, что фосфатные растворы определенной концентрации осаждают разные белковые фракции сыворотки крови с образованием очень мелкой эмульсии (Колб Г., 1976). По степени мутности растворов делали вывод о соотношении белков в исследуемом материале. В штатив помещали 7 пробирок (объемом 10 мл), обозначенных цифрами "0", "1", "2", "3", "4", "5", "6". В пробирку "0" помещали 10 мл дистиллированной воды, а в пробирки "5", "4", "3", "2", "1" – по 5 мл соответствующих фосфатных буферов: № 5 – 1,622 М, № 4 – 1,959 М, № 3 – 2,359 М, № 2 – 2,496 М, № 1 – 3,084 М ( $\text{pH} = 6,50 \pm 0,10$ ). В "6"-ю пробирку вносили 0,5 мл сыворотки, 0,75 мл дистиллированной воды и 3,75 мл раствора основного фосфатного буфера (3,347 М,  $\text{pH} = 6,50 \pm 0,10$ ). Содержание пробирки перемешивали 5-кратным переворачиванием её, избегая образования при этом пузырьков воздуха. Потом в пробирки с номерами 1-5 переносили по 0,5 мл полученной смеси, а в "0" пробирку добавляли 1 мл её. Содержания каждой пробирки аккуратно перемешивали и через 15 мин. измеряли оптическую плотность 5, 4, 3, 2 и 1 растворов против раствора из нулевой пробирки. Перед фотометрированием содержание всех пробирок ещё раз тщательно перемешивали, аккуратно поднимая со дна осадок. Оптическую плотность определяли на фотоэлектроколориметре при 670 нм с использованием кюветы с оптическим путем 10 мм. Для вычисления оптической плотности альбуминов от показателя "1"-й пробы отнимали показатель "2"-й пробы. Для вычисления оптической плотности  $\alpha_1$ -глобулинов от показателя "2"-й пробы отнимали показатель "3"-й пробы. Для вычисления оптической плотности  $\alpha_2$ -глобулинов от показателя "3"-й пробы отнимали показатель "4"-й пробы. Для определения оптической плотности  $\beta$ -глобулинов от показателя "4"-й пробы отнимали показатель "5"-й пробы. Показатель "5"-й пробы – это показатель  $\gamma$ -глобулинов. Дальше вычисляли соотношение каждой фракции в абсолютных процентах. Для исследования содержания белковых фракций использовали реактивы производства АО «Реагент» (Украина).

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере с помощью прикладного программного обеспечения Microsoft® 2003 Excel с использованием t-критерия Стьюдента. Рассчитывали среднюю величину (M), среднее квадратическое отклонение (m), достоверность различий (P). Кроме того, рассчитывали коэффициент вариации и использовали однофакторный дисперсионный анализ (по F-критерию Фишера). Различия между сравниваемыми группами считали достоверными при \* –  $P < 0,05$  (Johnson, 1992).

Результаты определения содержания белковых фракций в сыворотке крови сеголеток карпа соответствуют литературным данным по показателям альбуминов и  $\gamma$ -глобулинов (Иванов, 2003). В содержании  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов наблюдаются некоторые отличия, обусловленные сезоном или физиологическим состоянием рыб (рис. 1А). По данным К.Ф. Сорвачева (Сорвачев, 1982), фракция альбуминов у чешуйчатого карпа составляет 15,70%, а у зеркального – 17,26%, фракция глобулинов составляет 84,30% и 82,74% у чешуйчатого и зеркального карпа соответственно (Сорвачев, 1982). Согласно исследованиям В.Б. Адрианова (1937), результаты которых приводит К.Ф. Сорвачев, альбуминово-глобулиновое соотношение (А/Г коэффициент) у карпа составляет 0,641 (0,481-0,886). Рассчитанный А/Г коэффициент в нашем исследовании в сыворотке крови составил 0,84.



А



Б

Рисунок 1. Изменение содержания белковых фракций в сыворотке крови (А) и в печени (Б) сеголеток карпа в условиях действия гербицида «Раундапа» и «Раундапа» с БПС-44 ( $M \pm m$ ,  $n = 12$ . \* –  $P < 0,05$ ).

Под влиянием глифосата в крови происходит резкое снижение содержания альбуминов (в 1,8 раза) и соответствующее возрастание  $\alpha_1$ -,  $\gamma$ -глобулинов. Согласно литературным данным (Архипчук, 2008), при нарушениях функционального состояния печени белковый сдвиг крови характеризуется возрастанием именно

содержания глобулинов и снижением содержания альбуминов. В частности, известна способность альбуминов связывать различные вещества, в том числе токсические. Рост фракции глобулинов можно рассматривать как компенсаторную реакцию, направленную на выравнивание онкотического давления крови, которое снижается в результате патологического уменьшения выброса в кровь альбуминов (возможно, в результате нарушения их синтеза в печени) (Романенко, 1978). АТ коэффициент составил 0,35, что также может свидетельствовать о хроническом поражении печени, о наличии воспаления, распространении процесса зернистой и вакуольно-капельной дистрофии. Кроме того, существенно возрастает (в 9,5 раза) содержание фракции  $\alpha_1$ -глобулинов и снижается в 2,6 раза фракция  $\beta$ -глобулинов (в эту фракцию входит трансферин – переносчик железа), гемопексин (связывает гем и препятствует его выведению почками и потере железа), компоненты комплемента и часть иммуноглобулинов, в 2,5 раза возрастают  $\gamma$ -глобулины.

При использовании БПС-44 показатели альбуминов и  $\beta$ -глобулинов в сыворотке крови приближаются к контрольным значениям, а коэффициент АТ составляет 1,0, что может свидетельствовать о позитивных изменениях в организме рыб. Содержание  $\gamma$ -глобулинов по сравнению с контролем также несколько возрастает (на 19,2%). Высокая обеспеченность организма альбуминами и  $\gamma$ -глобулинами создает благоприятные предпосылки для оптимизации обменных процессов и гарантирует высокую неспецифическую резистентность. Однако наблюдаются определенные изменения во фракции  $\alpha$ -глобулинов: содержание  $\alpha_1$ -глобулинов приближается к норме по сравнению с влиянием «Раундапа», но уровень  $\alpha_2$ -глобулинов снижается ещё больше.

В печени сеголеток карпа под влиянием «Раундапа» (рис. 1Б) наблюдается рост относительного содержания альбуминов – на 17,0% и  $\gamma$ -глобулинов – на 26,1% (в эту фракцию входят иммуноглобулины, которые функционально являются антителами и обеспечивают иммунную защиту организма от инфекций и чужеродных веществ (Иванов, 2003)). Соответственно можно предположить протекание в организме рыб воспалительных процессов. Содержание остальных белковых фракций достоверно не отличается от контрольных значений (рис. 1Б).

Действие БПС-44 приводит к существенному изменению фракции  $\alpha_2$ -глобулинов (фракция  $\alpha_2$ -глобулинов преимущественно включает белки острой фазы:  $\alpha_2$ -макроглобулин (принимает участие в развитии инфекционных и воспалительных процессов), гаптоглобин (образовывает комплекс с гемоглобином, который освобождается из эритроцитов при внутрисосудном гемолизе), церулоплазмин (специфически связывает ионы меди, а также является оксидазой аскорбиновой кислоты, адреналина, диоксифенилаланина, способные инактивировать свободные радикалы), а также аполипопротеин В (принимает участие в транспорте липидов) (Иванов, 2003) – наблюдается возрастание содержания этой фракции в 3,1 раза. Существенным является и снижение в 1,8 раза фракции  $\alpha_1$ -глобулинов (эта фракция включает белки острой фазы:  $\alpha_1$ -антитрипсин (ингибитор многих протеолитических ферментов),  $\alpha_1$ -кислый гликопротеин (в зоне воспаления способствует фибриллогенезу), транспортные белки,  $\gamma$ -глобулины под влиянием БПС-44 тоже возрастают, хотя и не так существенно, как при влиянии раундапа – на 18,9%. Такие изменения данной фракции также могут свидетельствовать о негативных иммунных реакциях организма сеголеток карпа.

Таким образом, полученные результаты показали, что действие гербицида «Раундап» приводит к негативным изменениям в крови сеголеток карпа: уменьшается процент альбуминов и возрастает содержание  $\gamma$ -глобулинов как свидетельство наличия воспалительных процессов и снижения неспецифической



резистентности организма карпа. Действие пробиотического препарата БПС-44 в сыворотке крови приводит к позитивным изменениям: наблюдалось выравнивание всех показателей белковых фракций, кроме фракции  $\alpha_2$ -глобулинов.

### Список литературы

1. Архипчук В.В. Исследования в области цитологии рыб и биотестирования: Сб. научн. трудов. / Под. ред. М.В. Малиновской. – К.: "Реликвии", 2008. – 536.
2. Барбухо Е.В. Повышение жизнеспособности икры карпа при гербицидном загрязнении пробиотическим препаратом БПС-44 // Биология внутренних вод: тезисы докл. XIV Школы-конференции молодых ученых (Борок, 26–30 октября 2010 г.). — Борок, 2010. — С. 5.
3. Давыдов О.Н., Темниханов Ю.Д., Куровская Л.Я Патология крови рыб. – К.: МВЦ "Медінформ", 2005. – 210 с.
4. Жиденко А.О. Морфофізіологічні адаптації різновікових груп *Cyprinus carpio* L. за несприятливої дії екологічних факторів – Автореф. дис... докт. біол. наук. – зі спеціальності 03.00.16. – екологія. – Одеса, 2009– 40 с.
5. Иванов А.А. Физиология рыб. – М.: Мир, 2003. – 284 с.
6. Колб Г., Камышников С. Клиническая биохимия. – Минск: Беларусь, 1976. С. 20–22.
7. Мехед О.Б. Вплив пестицидного забруднення водного середовища на іхтіологічні показники та метаболічні перетворення в організмі коропа: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – зі спеціальності 03.00.10. – іхтіологія. К., 2005. – 20 с.
8. Романенко В.Д. Печень и регуляция межтучного обмена (млекопитающие и рыбы). – К.: Наук. думка, 1978. – 184 с.
9. Смольський О.С., Смольська Т.М., Агеев В.О. та ін. Регуляторна роль пробіотика БПС-44 на систему антиоксидантного захисту рыб в умовах зимівлі // Пробиотики — XXI століття. Біологія. Медицина. Практика: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції (20–22 травня 2004 р.). — Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. — С. 160–162.
10. Сорвачев К.Ф. Основы биохимии питания рыб. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 247 с.
11. Справочник по пестицидам: гигиена применения и токсикология. Сост. Л.К. Седокур, под ред. А.В. Павлова. – К.: Урожай, 1986. – 432 с.
12. Перелік пестицидів і агрохімікатів дозволених до використання в Україні. – Київ: Юнівест Маркетинг, 2001. – 274 с.
13. Johnson R.A., Wichern D.W. Applied multivariate statistical analysis – London: Prentice-Hall, 1992. – 154 p.
14. <http://www.3rm.info/5336-gerbicide-roundap-predstavlyaet-vysokuyu-opasnost.html>

### USE OF PROBIOTIC BPS-44 TO PREVENT THE TOXIC EFFECTS OF HERBICIDES ON FISH

A.A. Zhidenko, E.V. Bibchuk, V.V. Krivopisha

The regularities of changes in the protein fractions in the liver of carp fingerlings under the influence of the herbicide "Roundup", as the toxic factor of the aquatic environment and probiotic preparation BPS-44 to prevent the negative effect of glyphosate was investigated. The results indicate negative changes in the liver of carp fingerlings: lower percentage of albumin and increases the content of  $\gamma$ -globulin, which indicates the presence of inflammatory processes and reduction of nonspecific resistance of carp. Effect of probiotic preparation BPS-44 resulted in positive changes in blood serum: observed alignment of all protein fractions indicators, except fraction  $\alpha_2$ -globulins.